

Bestimmung von feline und canine proBNP

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von proBNP oder Fragmenten davon in Säugetieren.

Herzerkrankungen spielen nicht nur beim Menschen eine bedeutende Rolle, auch Tiere, im Speziellen Haustiere, wie Hunde und Katzen, sind von diesen Erkrankungen betroffen. Studien haben ergeben, dass beispielsweise jedes zehnte Hundeherz funktionsgestört ist. Die dabei auftretenden Herzerkrankungen betreffen beispielsweise die Herzklappen und den Herzmuskel. Da das Herz in der Lage ist Funktionsstörungen zunächst durch Mehrarbeit auszugleichen, bleibt eine solche Erkrankung zumeist verborgen, was zur Folge hat, dass sich durch die vermehrte Herzbelastung der Zustand des Herzens verschlechtert. Die aus Herzkrankheiten resultierenden Symptome, wie Müdigkeit, Kreislaufschwäche, Abgeschlagenheit, sind meist dann erkennbar, wenn das Herz des Haustieres die Schwäche nicht mehr kompensieren kann. In einem solchen Fall ist die Herzerkrankung bereits so weit fortgeschritten, dass eine vollständige Heilung kaum mehr möglich ist.

Chronische Herzklappen- und Herzmuskelveränderungen sind in der Regel nicht heilbar, wobei aber durch medikamentösen Einsatz das weitere Fortschreiten der Herzerkrankung verlangsamt werden kann. Aus diesem Grund ist es wichtig, eine Frühdiagnose für auftretende Herzerkrankungen zu stellen. Routinemäßig werden hierfür vor allem physikalische Methoden, wie das Abhören der Herztöne, die Aufnahme eines Elektrokardiogramms, Röntgen- und Ultraschalluntersuchungen, eingesetzt. Diese Untersuchungsmethoden weisen vor allem den Nachteil auf, dass sie erst dann durchgeführt werden können, wenn bereits sichtbare bzw. hörbare Schäden am Herzen direkt erkennbar werden. Des Weiteren benötigen physikalische Untersuchungsmethoden geeignete und in der Regel teure Vorrichtungen, um eine entsprechende Diagnose durchzuführen.

Die am häufigsten vorkommenden Herzkrankheiten beispielsweise bei Hunden sind Herzdekompensation und dilatative Kardiomyopathie, welche vorwiegend große Tiere betrifft. Dilatative Kardiomyopathie ist eine Herzerkrankung, die zu einer Vergrößerung der Herzkammern bei normal dicker Wand führt, wobei diese Vergrößerung rasch eine Herzschwäche im betroffenen Tier zur Folge hat. Durch die Zugabe von Taurin in Futtermitteln konnte

das Risiko an dilatativer Kardiomyopathie zu erkranken, signifikant reduziert werden. Bei einer der dilatativen Kardiomyopathie verwandten Krankheit, der restriktiven Kardiomyopathie, welche häufig in älteren Katzen beobachtet wird, ist eine kontinuierliche Abnahme der Herzfunktion mit einer reduzierten Pumpfähigkeit beobachtbar. Die bei Katzen am häufigsten vorkommende Herzerkrankung ist hypertrophe Kardiomyopathie. Diese Herzmuskelerkrankung führt zu einer Verdickung der Herzwand und einer daraus resultierenden reduzierten Fähigkeit, die Herzkammern mit Blut zu füllen. Das führt zu einer Anhäufung von Blut in der linken Herzkammer und zu einer stark reduzierten Menge an Blut, die durch den Körper gepumpt wird.

Bei vielen Herzerkrankungen, wie z.B. Herzinsuffizienz, dilatativer Kardiomyopathie, hypertropher Kardiomyopathie, linksventrikulärer Hypertrophie und Dysfunktion, wird ein Peptidhormon, das sogenannte BNP (brain natriuretic peptide) ausgeschüttet. Dieses Hormon bewirkt die Ausscheidung von Flüssigkeit über die Niere und reguliert somit das Herz-Kreislauf-System. Da dieses Peptid im Herzen produziert wird und bei Überlastung und Überfüllung des Herzens vermehrt produziert wird, ist die Bestimmung des BNP-Spiegels im Blut ein geeignetes Mittel zur Beurteilung von Herzschwäche.

BNP wie auch andere natriuretische Peptide spielen bei der Regulierung des Wasserhaushaltes und des Blutdrucks eine bedeutende Rolle. Wenn die Herzwand gedehnt wird, schüttet diese vermehrt BNP aus, was zu einer Ausscheidung von Natrium und Flüssigkeit über die Niere und zu einer Erweiterung der Blutgefäße führt, welche in Summe den Blutdruck und die Füllung des Herzens zu senken vermögen. BNP wird von den Herzmuskelzellen als proBNP synthetisiert, welches schließlich in n-terminales proBNP und BNP gespalten wird. Beide Teile des BNPs werden an das Blut abgegeben und können darin bestimmt werden.

Mit Herzerkrankungen bei Tieren beschäftigen sich unter anderem folgende einschlägigen Veröffentlichungen: Bright JM and Caii JV, J Am Vet Med Assoc 2000, 216:1110-4; Guglielmini C, Vet Res Commun 2003, 27 Suppl 1:555; Boswood A et al., J Small Anim Pract 2003, 44:104-8; Takemura N et al., J Vet Med Sei 2003, 65:1265-7; MacDonald KA et al., J Vet Intern Med 2003, 17:172-7; Greco DS et al., Can Vet J 2003, 44:293-7; Monnet E et al., J Am Vet Med Assoc 1997, 211:569-72; Hamlin RL et al., J Vet Intern

Med 1996, 10:85-7; Gaschen L et al., J Vet Intern Med 1999, 13:346-56.

Im Stand der Technik ist bereits eine Vielzahl an Verfahren bekannt, mit deren Hilfe humanes proBNP bzw. deren Fragmente im Serum eines Individuums detektiert werden kann. Beispielfhaft seien hierin die EP 0 648 228 B1, WO 03/87819 und FR 2 843 396 erwähnt .

In der US 2004/0018577 ist ein Immunoassay der mindestens drei Antikörper umfasst, welche alle an unterschiedlichen Epitopen eines Analyten zu binden vermögen offenbart. Die dabei zu detektierenden Analyten betreffen insbesondere die Detektion von Markern betreffend Herzerkrankungen, wobei unter anderem auch BNP und proBNP detektiert werden können.

Biondo A.W. et al. (Vet.Pathol. 2003, 40 (5) :501-506) beschreiben ein Verfahren zum Nachweis von ANP und BNP in Katzen mittels polyklonaler Antikörper, die gegen ein Peptid des ANP, welches die Aminosäuren 1 bis 28 umfasst, bzw. gegen ein Peptid, welches die Aminosäuren 43 bis 56 von proBNP umfasst, gerichtet sind.

In der EP 1 016 867 A1 wird ein Immunoassay für den Nachweis von preproBNP in Säugetieren beschrieben. Dabei werden Antikörper verwendet, die gegen Peptide, umfassend die Aminosäuren 27 bis 102, 73 bis 102 und 27 bis 64 von humanem BNP, gerichtet sind.

Jortani S.A. et al. (Clin.Chem.2003, 50 (2) :265-278) beschreiben die Verwendung von BNP und dessen prepro- und pro-Formen als mögliche Marker für Herzerkrankungen. In diesem Artikel werden keine bevorzugten Peptidregionen von BNP erwähnt, die sich eignen würden, Herzerkrankungen bei Hunden und Katzen nachzuweisen .

In der WO 2000/35951 werden mehrere Peptide geoffenbart, gegen welche Antikörper hergestellt werden können, die sich in einem Verfahren zur Diagnose von Herzerkrankungen eignen. Dabei werden drei Peptide, umfassend die Aminosäuren 1 bis 13, 37 bis 49 und 65 bis 76 des humanen Nt-pro-BNP-Proteins geoffenbart, welche auch zur Herstellung von Antikörpern, die gegen diese Peptide gerichtet sind, herangezogen werden können.

Des Weiteren gibt es am Markt mehrere Testkits zur Detektion von humanem proBNP bzw. deren Fragmente (z.B. von Roche und Biomedica) . Nichtsdestotrotz gibt es kein bekanntes Verfahren,

mit dessen Hilfe spezifisch proBNP in tierischen Proben bestimmt werden kann. Daher und aufgrund der kostenintensiven und aufwendigen physikalischen Untersuchungen von Tieren ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, geeignete Mittel zur Bestimmung von proBNP bzw. dessen Fragmenten zur Verfügung zu stellen.

Daher sieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung von felinelem oder caninelem proBNP oder Fragmenten davon umfassend die Schritte:

- Bereitstellen einer felineen oder canineen Probe,
- Inkontaktbringen der Probe mit mindestens einem Antikörper, der bei der Bestimmung von felinelem proBNP oder Fragmenten davon an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20-42 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 57-80 des felineen proBNP und bei der Bestimmung von caninelem proBNP oder Fragmenten davon an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20 bis 86 des canineen proBNP 's bindet, und
- Bestimmen der Anwesenheit und/oder Konzentration des in der Probe vorhandenen felineen oder canineen proBNP 's oder Fragmenten davon, vor.

Es wurde festgestellt, dass ein Antikörper, der an ein Epitop in den offenbarten Bereichen des felineen bzw. canineen proBNP binden kann, sich sehr gut eignet, um proBNP spezifisch zu bestimmen.

Es wird darauf hingewiesen, dass die hierin offenbarten felineen und canineen proBNP-Sequenzen beispielhaft für die Familie der Felidae bzw. der Canidae herangezogen wurden, womit einzelne von diesen hierin offenbarten Sequenzen abweichende Aminosäuren in den proBNP Sequenzen von Tieren anderer Gattungen dieser Familien ebenfalls unter die hierin offenbarten Sequenzen fallen, sofern diese abweichenden Aminosäuren nicht die Epitope der hierin offenbarten Antikörper in der Weise betreffen, dass eine spezifische Bindung nicht mehr ermöglicht wird. Die Aminosäuresequenzen, die hierin offenbart sind, sind in öffentlichen Datenbanken (z.B. Swiss-Prot: canines BNP - P16859 und felines BNP - Q9GLK4) publiziert.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Proben umfassen flüssige Proben, wie beispielsweise Blut, Urin, aber auch Gewebeproben, wie beispielsweise Gewebeschnitte der Herzmuskulatur oder des Gehirns. Je nach Bedarf können die Proben entspre-

chend aufbereitet werden, um beispielsweise das spätere in Kontakt Bringen der Probe mit den erfindungsgemäßen Antikörpern zu erleichtern bzw. zu ermöglichen. So können aus Blutproben Fraktionen enthaltend proBNP bzw. Fragmente davon, bereitgestellt werden oder aber auch Gewebeproben können beispielsweise homogenisiert und ebenfalls von nicht-proteinhaltigen Fraktionen abgetrennt werden.

Die Bindung von mindestens einem Antikörper an ein Epitop des felines oder caninen proBNP in der Probe bedeutet, dass der Antikörper in der Lage ist, ein Epitop in einem definierten Sequenzbereich eines spezifischen Proteins zu binden, wobei der mindestens eine Antikörper nicht in der Lage ist Epitope des Proteins außerhalb des definierten Bereiches spezifisch zu binden.

Erfindungsgemäß kann ein Antikörper der ein Epitop zu binden vermag eingesetzt werden um proBNP oder Fragmente davon zu bestimmen. Dennoch kann es von Vorteil sein mehrere (z.B. zwei, drei, vier oder fünf) Antikörper, welche verschiedene Epitope des proBNP zu binden vermögen, einzusetzen.

Die Anwesenheit bzw. die Konzentration des in der Probe befindlichen felines oder caninen proBNP oder Fragments davon kann durch im Stand der Technik bekannte Methoden festgestellt werden. Beispielhaft sei hierbei die Durchführung von Enzym-Immunoassays (z.B. ELISA) bei flüssigen Proben bzw. immunhistochemischen Verfahren bei Gewebeproben erwähnt.

„Antikörper“ gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen auch Fragmente von Antikörpern, die in der Lage sind ein erfindungsgemäßes Epitop zu erkennen. So kann ein Antikörper beispielsweise lediglich aus dem F(ab)-Teil bestehen, der die antigenbindende Seite aufweist. Diese Antikörperfragmente können des Weiteren Teil eines bispezifischen Antikörpers oder eines „Heterominibodies“ (siehe z.B. EP 1 100 830 B1) sein.

„proBNP oder deren Fragmente“ umfassen erfindungsgemäß alle proBNP Bruchstücke, die in vivo entstehen (z.B. Nt-proBNP) oder in vitro erzeugt werden (z.B. durch Versetzen einer Probe mit Protease oder chemischen Substanzen wie CNBr), und die erfindungsgemäßen Epitope aufweisen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform bindet der mindestens eine Antikörper an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25-35 und/oder im Bereich umfassend die

Aminosäuren 45-55 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 60-80 des felines proBNP.

Es wurde gezeigt, dass vor allem die oben angeführten Aminosäurenbereiche des felines proBNP Epitope aufweisen, die eine spezifische Bindung von Antikörpern erlauben.

In einem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung können mehrere Antikörper, die mehrere unterschiedliche Epitope an felines bzw. caninen proBNP spezifisch zu binden vermögen, eingesetzt werden. Aus diesem Grund kann mindestens ein Antikörper, der an mindestens ein Epitop zu binden vermag, erfindungsgemäß eingesetzt werden. Weiters sei hierbei angemerkt, dass die hier angegebenen Aminosäurebereiche nicht nur ein Epitop, sondern je nach Größe mehrere Epitope umfassen können. Somit umfasst das erfindungsgemäße Verfahren die Verwendung einer Kombination mehrerer Antikörper, die an mindestens ein Epitop spezifisch binden können.

Erfindungsgemäß bindet bei der Bestimmung von caninen proBNP oder Fragmenten davon der mindestens eine Antikörper an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25-41 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 55-65 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 74-86 des caninen proBNP.

Antikörper, die Epitope in diesen Bereichen erkennen, eignen sich besonders gut zur Bestimmung von proBNP bzw. dessen Fragmente in einer Probe caninem Ursprungs.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das mindestens eine Epitop mindestens drei, mindestens vier, mindestens fünf, mindestens sechs, mindestens sieben, mindestens acht, mindestens neun, mindestens zehn Aminosäuren.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der mindestens eine Antikörper polyklonal und/oder monoklonal.

Die in einem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Antikörper können sowohl polyklonal als auch monoklonal sein. Zur Herstellung dieser Antikörper werden Peptidfragmente umfassend die hierin offenbarten Aminosäurebereiche des felines bzw. des caninen proBNP verwendet. Diese Peptidfragmente können entweder synthetisch (Merrifield R.P., 1963, J Am Chem Soc 85, 2000, 149), rekombinant oder durch chemischen oder enzymatischen Abbau von proBNP rekombinanten oder nativen Ursprungs hergestellt werden. Die daraus gewonnenen Peptide werden abhängig von ihrer Größe an einen immunogenen Träger (z.B. KLH) gebunden oder di-

rekt zur Herstellung von polyklonalen oder von monoklonalen Antikörpern (z.B. Köhler G. and Milstein C , 1975, Nature 256:495; Galfre et al., 1977, Nature 266:550) eingesetzt. Erfindungsgemäß können die Antikörper auch rekombinant hergestellt werden. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Antikörpern sind dem Fachmann hinreichend bekannt (siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 2001) .

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bindet an den mindestens einen Antikörper oder an das mindestens eine Epitop mindestens ein weiterer Antikörper, wodurch beispielsweise die Ausführung des erfindungsgemäßen Tests als Sandwich-Assay ermöglicht wird.

Die Bindung eines weiteren Antikörpers an den mindestens einen Antikörper ermöglicht es, diesen und indirekt das an den mindestens einen Antikörper gebundene Epitop qualitativ bzw. quantitativ zu bestimmen. Bindet der mindestens eine weitere Antikörper an das mindestens eine Epitop, ist es möglich, die Bindung des mindestens einen Antikörpers an das mindestens eine Epitop, wenn beispielsweise der mindestens eine Antikörper an eine Festphase immobilisiert ist, qualitativ bzw. quantitativ über ein Enzymimmunoassay zu bestimmen.

Vorzugsweise ist der mindestens eine Antikörper und/oder der mindestens eine weitere Antikörper markiert.

Der mindestens eine Antikörper und/oder der mindestens eine weitere Antikörper ist dabei mit Enzym, wie Peroxidase, insbesondere Meerrettich-Peroxidase, Biotin, Fluoreszenzfarbstoff, insbesondere Fluoreszein (FITC, DFTF) , R-Phycoerythrin (PE) , Peridiniumchlorophyll-Protein (PerCP) und Tandemkonjugate wie PE-Cy5 oder PE-Texas-Rot, Goldkolloid oder Radionuklide markiert.

Durch die Markierung eines der beiden Antikörper ist es möglich, durch eine Sekundärreaktion oder aber auch direkt die Anwesenheit bzw. Konzentration des markierten Antikörpers gebunden an das mindestens eine Epitop zu bestimmen. Die Antikörper selbst könnten wiederum durch Protein A Konjugate (z.B. Protein A Gold Konjugat) detektiert werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der mindestens eine Antikörper oder der mindestens eine weitere Antikörper an eine Festphase gebunden.

Durch die Bindung des mindestens einen Antikörpers oder des

mindestens einen weiteren Antikörpers können beispielsweise Antikörperchips, beschichtete Mikrotiterplatten oder Lateral Flow Devices hergestellt werden, die in einer Vielzahl von Verfahren eingesetzt werden können.

Vorzugsweise erfolgt die Bestimmung von feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon durch ein Verfahren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Radioimmunoassay, Immunbindungsassay, Westernblot, Immunhistochemie, Enzymimmunoassay, Lateral Flow Device (LFD, Teststreifen) und Kombinationen davon.

Die oben erwähnten Verfahren sind dem Fachmann hinreichend bekannt. Ein Überblick über diese Verfahren kann beispielsweise in „Bioanalytik“ (Lottspeich und Zorbas, Spektrum Verlag 1998) gefunden werden. Lateral Flow Devices (LFD, Teststreifen) sind beispielsweise in der WO 02/059567 offenbart.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Antikörper oder Antikörpermischungen, die an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20-42 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 57-80 des feline proBNP binden.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform binden die Antikörper oder Antikörpermischungen an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25-35 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 45-55 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 60-80 des feline proBNP.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung einen Antikörper oder eine Antikörpermischung, die an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20-86 des canine proBNP binden.

Vorzugsweise bindet der Antikörper oder die Antikörpermischung an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25-41 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 55-65 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 74-86 des canine proBNP.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform bindet der Antikörper oder die Antikörpermischung an ein Epitop, das mindestens drei, mindestens vier, mindestens fünf, mindestens sechs, mindestens sieben, mindestens acht, mindestens neun, mindestens zehn Aminosäuren umfasst. Die erfindungsgemäßen Epitope sind vorzugsweise höchstens 40, höchstens 35, höchstens 30, insbesondere höchstens 25, höchstens 20 oder höchstens 15 Aminosäuren

lang.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Peptid umfassend drei Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 20-42 und/oder im Bereich der Aminosäuren 57-80 des feline proBNP.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfasst das Peptid mindestens drei Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 25-35 und/oder im Bereich der Aminosäuren 45-55 und/oder im Bereich der Aminosäuren 60-80 des feline proBNP.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Peptid umfassend drei Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 20-86 des canine proBNP.

Vorzugsweise umfasst das Peptid mindestens drei Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 25-41 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 55-65 und/oder im Bereich der Aminosäuren 74-86 des canine proBNP.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird das Peptid chemisch synthetisiert oder von einer Probe isoliert bzw. rekombinant hergestellt.

Um das Epitop aus einem Peptid, welches aus einer Probe isoliert bzw. rekombinant hergestellt wurde, entsprechend herzustellen, kann dieses mit an sich bekannten enzymatischen bzw. chemischen Methoden weiterverarbeitet werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines erfindungsgemäßen Antikörpers oder einer Antikörpermischung zur Bestimmung von feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon in dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Die erfindungsgemäßen Peptide können in kompetitiven Immunoassays in markierter Form eingesetzt werden.

Vorzugsweise werden die Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung zur Herstellung eines Antikörpers oder einer Antikörpermischung verwendet werden.

Des Weiteren werden die Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung als Positivkontrolle bzw. als Standard für Konzentrationsbestimmungen in einem erfindungsgemäßen Verfahren angewendet.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Kit zur Bestimmung von feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon, umfassend mindestens einen erfindungsgemäßen Antikörper oder mindestens eine erfindungsgemäße Antikörpermischung, Mittel zur qualitativen und/oder quantitativen Detektion

einer Bindung des mindestens einen Antikörpers oder der mindestens einen Antikörpermischung an feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon und gegebenenfalls erfindungsgemäße Peptide und/oder feline oder canine proBNP oder Fragmente davon als Positiv-Kontrolle oder Standard für eine Konzentrationsbestimmung.

Erfindungsgemäß kann der Kit mindestens einen weiteren Antikörper umfassen.

Dieser zusätzliche Antikörper weist eine Avidität zum mindestens einen Antikörper oder aber auch zum mindestens einen Epitop auf.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der mindestens eine Antikörper und/oder der mindestens eine weitere Antikörper markiert.

Vorzugsweise umfasst die Markierung Enzyme, wie Peroxidasen, insbesondere Meerrettich-Peroxidase, Biotin, Fluoreszenzfarbstoffe, insbesondere Fluorescein (FITC, DFTF), R-Phycoerythrin (PE), Peridiniumchlorophyll-Protein (PerCP) und Tandemkonjugate wie PE-Cy5 oder PE-Texas-Rot, Goldkolloid oder Radionuklide.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines erfindungsgemäßen Kits in einem Verfahren zur Bestimmung von feline oder canine proBNP.

Mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung ist es möglich nicht nur proBNP und dessen Fragmente in Katzen und Hunden nachzuweisen sondern auch in anderen Säugetieren wie Pferden, Rindern, Elefanten, Mäusen (Swiss-Prot: P40753), Schweinen (Swiss-Prot: P07634), Ratten (Swiss-Prot: P13205), Kamelen (Swiss-Prot: Q6L7Z3) und Schafen (Swiss-Prot: 046541) und Fischen, wie Barschen (Swiss-Prot: Q805E8), Stören (Swiss-Prot: P83965) und Kugelfischen (Swiss-Prot: Q805D7).

Um proBNP in den oben genannten Tieren nachzuweisen, sind Antikörper, die an mindestens einem Epitop in einem Aminosäurebereich von Aminosäurerest 1 bis Aminosäurerest 80 des entsprechenden proBNPs binden, bevorzugt. Insbesondere sind Antikörper bevorzugt, die an mindestens einem Epitop umfassend die Aminosäurebereiche 1-15, 15-30, 20-30, 25-35, 30-40, 35-50, 35-55, 45-55, 50-70, 60-70, 60-80 und 70-80 binden. Die folgenden besonders bevorzugten spezifischen Epitope wurden ebenfalls mit dem der vorliegenden Erfindung zugrunde liegenden Schema aufgefunden (siehe Beispiele).

Tabelle 1

	<i>Swiss-Prot Nr.</i>	<i>AS-Bereich</i>
Maus	P40753	1-15, 20-30, 50-70
Schwein	P07634	20-30, 35-50, 60-70
Ratte	P13205	1-15, 30-40, 45-55, 60-80
Kamel	Q6L7Z3	20-30, 55-65, 70-80
Schaf	O46541	1-15, 20-30, 45-55, 60-80
Barsch	Q805E8	15-30, 35-50, 70-80
Stör	P83965	1-20, 25-35, 70-80
Kugelfisch	Q805D7	15-30, 35-55, 60-80

Die bevorzugten Längen der Epitope sind, wie oben für Hunde und Katzen angegeben, auch für die oben genannten Tiere gegeben.

Die vorliegende Erfindung ist weiters durch die folgenden Beispiele und Figuren veranschaulicht, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein.

Fig.1 zeigt Epitop-Erkennungsfaktoren (Recognition factors) entsprechend dem Programm ProtScale der caninen proBNP-Aminosäuresequenz (Fig. 1A) und Aminosäuresequenzen der erfindungsgemäßen caninen proBNP-Epitope (Fig. 1B).

Fig. 2 zeigt Epitop-Erkennungsfaktoren (Recognition factors) der felines proBNP-Aminosäuresequenz berechnet mit ProtScale (Fig. 2A) und Aminosäuresequenzen der erfindungsgemäßen felines proBNP-Epitope (Fig. 2B).

Fig. 3 zeigt Standardkurven basierend auf ELISA-Untersuchungen unter Verwendung von erfindungsgemäßen Antikörpern mit caninem (Fig. 3A) und feline (Fig. 3B) proBNP. Es konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die proBNP-Bestimmung mit den erfindungsgemäßen Antikörpern über einen weiten Konzentrationsbereich linear verläuft.

Fig. 4 zeigt die Bestimmung von proBNP in 47 kranken und 28 gesunden Katzen. Die Konzentration von proBNP in den Proben ermöglicht es die Schwere der Krankheit zu bestimmen. FAT - Feline atriale Thrombose, HKMP - hypertrophe Kardiomyopathie, LVH - linksventrikuläre Hyertrophie.

BEISPIELE:

Beispiel 1: Herstellung der Antikörper

Epitope können beispielsweise durch Berechnung mit ProtScale (<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>) nach dem Algorithmus von Fraga s. ("Theoretical prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences ." , 1982; Can. J. Chem. 60:2606-2610) bestimmt werden.

Die Peptidfragmente wurden aus denjenigen Bereichen der Aminosäuresequenz des felines oder caninen Nt-proBNP ausgewählt bei denen ein Maximum der Epitop-Erkennungsfaktoren (entsprechend den Ergebnissen des ProtScale-Programms) erhalten wurden, da diese Epitope sich als besonders immunogen herausgestellt haben und leicht zugänglich für Antikörper sind. Die ausgewählten Peptide des felines oder caninen proBNP wurden chemisch synthetisiert und an ein geeignetes Träger-Protein (z.B. KLH) konjugiert .

Je ein an KLH konjugiertes Peptid/Epitop wurde drei Schafen injiziert. Jedes Schaf erhielt für die erste Immunisierung 0.5 mg des entsprechenden Antigens vermischt mit Freund'schem Adjuvans (Guildhay, UK) und BCG (Bacillus Calmette Guerlin) und 0.25 mg der Immunogene für das weitere Steigern der Immunantwort.

Erfindungsgemäß hat sich gezeigt, dass der Einsatz von polyklonalen Antikörpern sehr gute und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Dennoch ist der Einsatz von monoklonalen Antikörpern in einem Verfahren wie in der vorliegenden Erfindung beschrieben ebenfalls möglich. Monoklonale Antikörper gegen Peptide/Epitope des felines oder caninen proBNP können durch dem Fachmann bekannte Standardmethoden hergestellt werden (siehe hierzu beispielsweise Köhler G und Milstein c, Nature, 1975, 256:495-497).

Beispiel 2: Bestimmung der Antikörperreaktivität mittels ELISA

Die Reaktivität von Antikörpern bzw. Seren gegen Peptide/Epitope des proBNP's, welche aus dem Blut der Schafe gewonnen werden, wurde mit Hilfe eines ELISA-Tests untersucht. Zunächst wurden die Mikrotiterplatten über Nacht bei 4°C mit Streptavidin (0.5 µg/ml, 200 µl pro Well) beschichtet, gewaschen, mit 1% BSA in 0,1 M PBS pH 7,5 enthaltend 0.25 % Tween 20 blockiert, nochmals gewaschen und für 3 h bei 4°C mit synthetischen proBNP Peptidsequenzen konjugiert an Biotin (0.25 µg/ml, 200 µl pro Well) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff wurden die Serum-Proben mit 0,1 M Phosphatpuffer enthaltend 3%

BSA 1:1000/1:10000/1:100000 verdünnt und auf die Mikrotiterplatte aufgebracht. Die Bindung der Antikörper an den Peptiden/Epitopen auf der Platte wurde durch die Zugabe von Anti-Schaf-IgG Antikörpern, welche mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert sind, und von einer Substratlösung umfassend TMB (Tetramethylbenzidin) festgestellt. Die Reaktion der Meerrettich-Peroxidase mit TMB wurde durch die Zugabe von 0,9% Schwefelsäure gestoppt. Die Farbentwicklung wurde mit einem Photometer, welches in der Lage ist Mikrotiterplatten zu analysieren, überwacht.

Beispiel 3: Nt-proBNP Messung in Proben gesunder und kranker Tiere

In die Wells einer Mikrotierplatte beschichtet mit einem der erfindungsgemäßen Antikörper wurden 20µl felines oder canines Serum pipettiert und mit 200µl eines zweiten weiteren, Peroxidase markierten erfindungsgemäßen Antikörper in 0.1M Phosphatpuffer pH 7 bei Raumtemperatur für 4-16h inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotierplatte mit 5 x 300 µl 0.1M Phosphatpuffer pH 7 mit 0.1% Triton X100 gewaschen und 200µl Tetramethylbenzidin als Substrat zugesetzt. Nach 20-30 Minuten Farbentwicklung wird die Reaktion durch Zusatz von 50µl 0.9% Schwefelsäure gestoppt und die Farbintensität, welche direkt proportional zur Menge an Nt-proBNP ist, mit einem Mikrotierplatten-Photometer gemessen. Die genaue Konzentration wird durch Vergleich mit einer Eichkurve aus rekombinantem felinen oder caninen Nt-proBNP bestimmt.

Beispielhaft wurde die Konzentration von Nt-pro-BNP in 8 gesunden und in 15 herzkranken Hunden mit Hilfe von Antikörpern gegen Epitope im Bereich der Aminosäuren 25-41 und 74-86 des caninen Nt-proBNPs bestimmt (Tabelle 2):

Tabelle 2

Gesundheitszustand	Nr.	canines Nt-proBNP
gesund		<i>pmol/l</i>
	1	862
	2	1060
	3	753
	4	531
	5	980
	6	674
	7	695

- 14 -

	8	1010
herzkrank		
	43	2460
	44	1950
	45	2140
	46	2170
	47	1480
	48	1560
	49	1390
	50	1450
	51	1520
	52	1790
	53	1310
	54	1140
	55	1975
	57	1720
	58	3020

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit den Antikörpern der vorliegenden Erfindung die Konzentration von Nt-proBNP im Serum von Tieren effizient bestimmt werden kann und mit deren Ergebnisse eine Diagnose über den Gesundheitszustand erstellt werden kann bzw. der Verlauf einer Therapie überwacht werden kann.

Fig. 4 zeigt des Weiteren die Bestimmung von Nt-proBNP in 47 kranken und 28 gesunden Katzen. Dabei wurde festgestellt, dass die Konzentration von detektiertem Nt-proBNP in direkten Zusammenhang mit der Schwere der Herzerkrankung steht. Bei diesen Versuchen wurden Antikörper die Epitope im Bereich umfassend die Aminosäuren 35 bis 45 und 68 bis 80 binden eingesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen zahlreiche Veröffentlichungen, in denen ein ähnlicher Zusammenhang postuliert wurde.

Beispiel 4: Kreuzreaktivität

Rekombinantes felines, canines und humanes Nt-proBNP wurden auf Mikrotierplatten beschichtet (250ng/ml, 200µl/well, über Nacht Raumtemperatur). Die Platten wurden anschließend gewaschen, und mit einer Verdünnung der anti-humanen, anti-felinen und anti-caninen Antisera (10-100µg/ml, in 0.1M Phosphatbuffer pH 7) in Kontakt gebracht. Die Menge gebundener Antikörper wurde nach einem Waschschrift mit einem geeigneten sekundären Antikörper (Peroxidase markierter Anti-Schaf Antikörper), gemessen.

Dabei zeigte sich, dass die jeweiligen Antikörper sehr gut mit den entsprechenden Nt-proBNP Molekülen reagierten (also anti-feliner Antiserum mit felinem Nt-proBNP) aber überraschenderweise nicht oder in sehr geringem Ausmass mit den Nt-proBNP Molekülen der jeweiligen anderen Spezies.

Es konnte gezeigt werden, dass die Antikörper, die gegen Epitope des felinen Nt-proBNP erzeugt wurden, eine hohe Spezifität aufweisen und nur in einem sehr geringen Ausmaß an die entsprechende humane Sequenz binden kann. Da bei der Messung der Antikörper-Spezifität Nt-proBNP als gesamtes Polypeptid als Bindungspartner eingesetzt wurde und nicht die Peptide, die für die Herstellung der Antikörper verwendet wurden, konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die Antikörper gegen feline Epitope des Nt-proBNP keine Kreuzreaktion über den gesamten Sequenzbereich des humanen Nt-proBNP aufweisen. Eine Ausnahme bildet lediglich der Antikörper der im Bereich der Aminosäuren 1 bis 20 des felinen Nt-proBNP bindet. Dieser Antikörper zeigt bei der Bindung an felinem Nt-proBNP nur eine doppelt so hohe relative Reaktivität als bei der Bindung an humanen Nt-proBNP.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen humane Epitope des Nt-proBNP ebenfalls eine geringe Reaktivität gegenüber felinem Nt-proBNP aufweisen. Somit konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass Antikörper, die gegen Epitope des humanen Nt-proBNP gerichtet sind nicht an felinem Nt-proBNP binden können und somit nicht zur Bestimmung von Nt-proBNP in Katzen herangezogen werden können (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3

Antiserum Nr.	Antikörper-Spezifität	Relative Reaktivität	Rel. Reaktivität gegenüber den entsprechenden humanen Sequenzen
S2189	AA 1-20 felin	2.3	1.2
S2190	AA 45-55 felin	3.7	0.01
S2191	AA 25-35 felin	1.0	0.2
S2192	AA 60-80 felin	4.2	0.3
S2072	AA 8-29 human	0.4	-----
S2104	AA 32-57 human	0.25	-----
S2102	AA 60-80 human	1.7	-----

Die Kreuzreaktivität wurde ebenfalls mit Antikörpern gegen Epitope des caninen Nt-proBNP und mit Antikörpern gegen Epitope

des humanen Nt-proBNP getestet. Auch bei caninen Sequenzen konnte ein vergleichbares Ergebnis wie bei den Untersuchungen mit feline Sequenzen erzielt werden (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4

Antiserum Nr.	Antikörper- Spezifität	Relative Reaktivität	Rel. Reaktivität gegenüber den entsprechenden humanen Sequen- zen
S2195	AA 1-22 canin	2.2	1.1
S2196	AA 25-41 canin	6.3	0.2
S2197	AA 55-65 canin	1.0	0.03
S2198	AA 74-86 canin	1.9	0.6
S2072	AA 8-29 human	0.1	-----
S2104	AA 32-57 human	0.3	-----
S2102	AA 60-80 human	1.5	-----

Patentansprüche :

1. Verfahren zur Bestimmung von felinelem oder caninelem proBNP oder Fragmenten davon umfassend die Schritte:

- Bereitstellen einer felinelem oder caninelem Probe,
- Inkontaktbringen der Probe mit mindestens einem Antikörper, der bei der Bestimmung von felinelem proBNP oder Fragmenten davon an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20 bis 42 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 57 bis 80 des felinelem proBNP und bei der Bestimmung von caninelem proBNP oder Fragmenten davon an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20 bis 86 des caninelem proBNP bindet, und
- Bestimmen der Anwesenheit und/oder Konzentration des in der Probe vorhandenen felinelem oder caninelem proBNP oder Fragmenten davon.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass bei der Bestimmung von felinelem proBNP oder Fragmenten davon der mindestens eine Antikörper an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25 bis 35 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 45 bis 55 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 60 bis 80 des felinelem proBNP bindet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass bei der Bestimmung von caninelem proBNP oder Fragmenten davon der mindestens eine Antikörper an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25 bis 41 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 55 bis 65 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 74 bis 86 des caninelem proBNP bindet.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine Epitop mindestens 3 Aminosäuren umfasst.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Antikörper polyklonal und/oder monoklonal ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet,

- 18 -

zeichnet, dass an den mindestens einen Antikörper oder an das mindestens eine Epitop mindestens ein weiterer Antikörper bindet .

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Antikörper und/oder der mindestens eine weitere Antikörper markiert ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Antikörper und/oder der mindestens eine weitere Antikörper mit Peroxidase, insbesondere Meerrettich-Peroxidase, Biotin, Fluoreszenzfarbstoff, Goldkolloid oder Radionuklide markiert ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Antikörper oder der mindestens eine weitere Antikörper an eine Festphase gebunden ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung von feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon durch ein Verfahren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Radioimmunassay, Immunbindungsassay, Westernblot, Immunhistochemie, Enzymimmunoassay, Lateral Flow Device (LFD, Teststreifen) und Kombinationen davon, erfolgt.

11. Antikörper oder Antikörpermischung, dadurch gekennzeichnet, dass dieser/diese an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20 bis 42 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 57 bis 80 des feline proBNP's bindet.

12. Antikörper oder Antikörpermischung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass dieser/diese an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25 bis 35 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 45 bis 55 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 60 bis 80 des feline proBNP bindet.

13. Antikörper oder Antikörpermischung, dadurch gekennzeichnet, dass dieser/diese an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20 bis 86 des canine proBNP bindet.

14. Antikörper oder Antikörpermischung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass dieser/diese an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25 bis 41 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 55 bis 65 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 74 bis 86 des caninen proBNP bindet.

15. Antikörper oder Antikörpermischung nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine Epitop mindestens 3 Aminosäuren umfasst.

16. Peptid, dadurch gekennzeichnet, dass dieses mindestens 3 Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 20 bis 42 und/oder im Bereich der Aminosäuren 57 bis 80 des felines proBNP umfasst.

17. Peptid nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass dieses mindestens 3 Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 25 bis 35 und/oder im Bereich der Aminosäuren 45 bis 55 und/oder im Bereich der Aminosäuren 60 bis 80 des felines proBNP umfasst.

18. Peptid, dadurch gekennzeichnet, dass dieses mindestens 3 Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 20 bis 86 des caninen proBNP umfasst.

19. Peptid nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass dieses mindestens 3 Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 25 bis 41 und/oder im Bereich der Aminosäuren 55 bis 65 und/oder im Bereich der Aminosäuren 74 bis 86 des caninen proBNP umfasst.

20. Peptid nach einem der Ansprüche 16 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid ein chemisch synthetisiertes, von einer Probe isoliertes oder rekombinant hergestelltes Peptid ist.

21. Verwendung eines Antikörpers oder einer Antikörpermischung nach einem der Ansprüche 11 bis 15 zur Bestimmung von feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

22. Verwendung eines Peptids nach einem der Ansprüche 16 bis 20 zur Herstellung eines Antikörpers oder einer Antikörpermischung

nach einem der Ansprüche 11 bis 15.

23. Verwendung eines Peptids nach einem der Ansprüche 16 bis 20 als Positiv-Kontrolle oder als Standard für eine Konzentrationsbestimmung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

24. Kit zur Bestimmung von feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon umfassend mindestens einen Antikörper oder mindestens eine Antikörpermischung nach einem der Ansprüche 11 bis 15, Mittel zur qualitativen und/oder quantitativen Detektion einer Bindung des mindestens einen Antikörpers oder der mindestens einen Antikörpermischung an feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon und gegebenenfalls Peptide nach einem der Ansprüche 16 bis 20 und/oder feline oder canine proBNP oder Fragmente davon als Positiv-Kontrolle oder Standard für eine Konzentrationsbestimmung .

25. Kit nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zur qualitativen und/oder quantitativen Detektion einer Bindung des mindestens einen Antikörpers oder der mindestens einen Antikörpermischung an feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon mindestens einen weiteren Antikörper umfassen.

26. Kit nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Antikörper und/oder der mindestens eine weitere Antikörper markiert ist.

27. Kit nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Antikörper und/oder der mindestens eine weitere Antikörper mit Peroxidase, insbesondere Meerrettich-Peroxidase, Biotin, Fluoreszenzfarbstoff, Goldkolloid oder Radionuklide markiert ist.

28. Verwendung eines Kits nach einem der Ansprüche 24 bis 27 in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

1/4

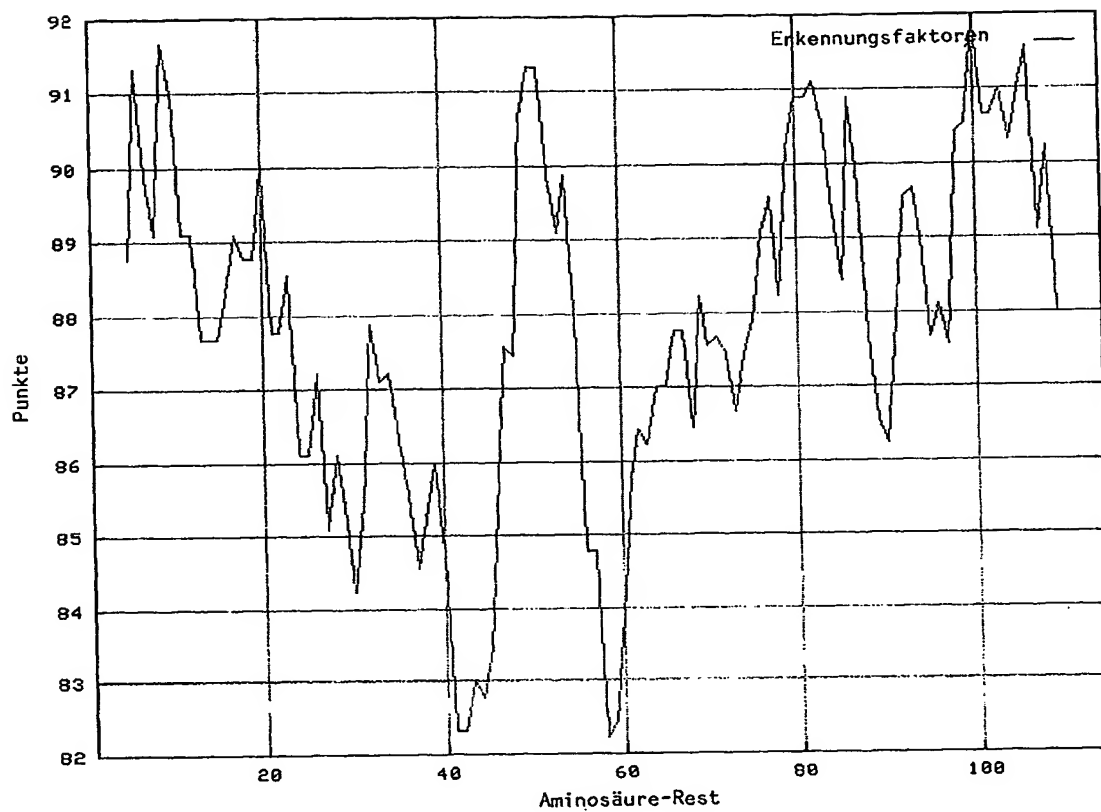


Fig. 1A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
ID																						
Epitop 1, AA 1-22					G	R	S	P			E	A	E	A	S					V	Q	E
Epitop 2, AA 25-41	Q	E	L	L					D			S	E									
Epitop 3, AA 32-48			A	V			L	Q						L	E	P	L					
Epitop 4 AA 45-55			P	L			S	H														
Epitop 5 AA 74-86			Q	A			R	L														

Fig. 1B

2/4

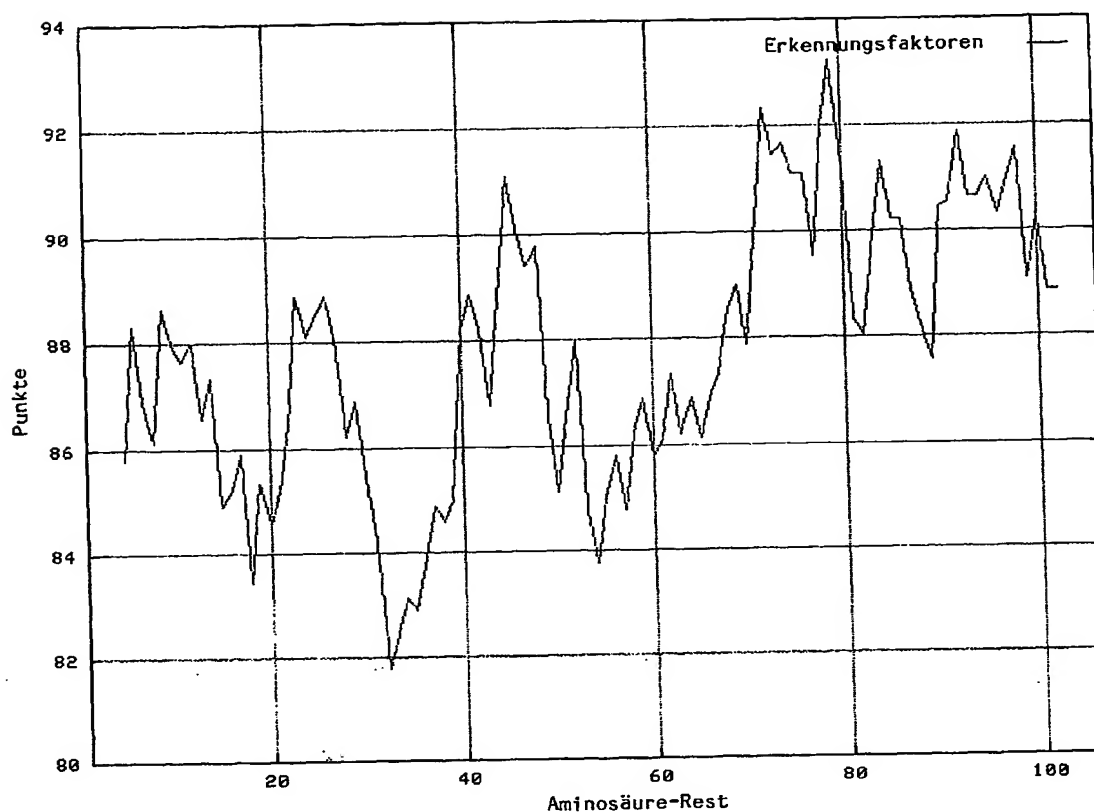


Fig. 2A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Epitop 1, AA 1-20	M	A	L	G	P	P	P	P	A	G	E	A	S	A	I	G	P	L	L	D		
Epitop 2, AA 35-45	M	A	L	G	P	P	P	P	A	G	H	S										
Epitop 3, AA 45-60	H	S	P	A	E	S	P	E	A	Q	E	E	P	P	A	R						
Epitop 4, AA 68-80	V	L	A	P	H	D	N	P	P	R	A	L	P	R	L	G	S	S	P	K	V	

Fig. 2B

3/4

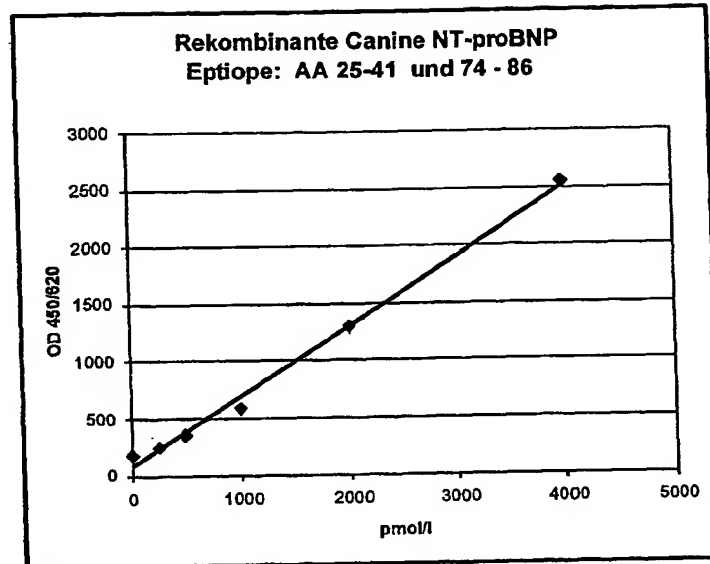


Fig. 3A

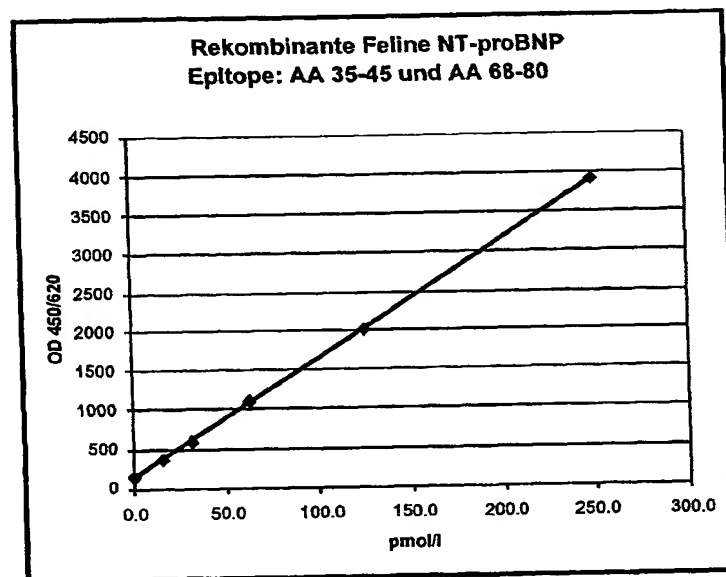


Fig. 3B

4/4

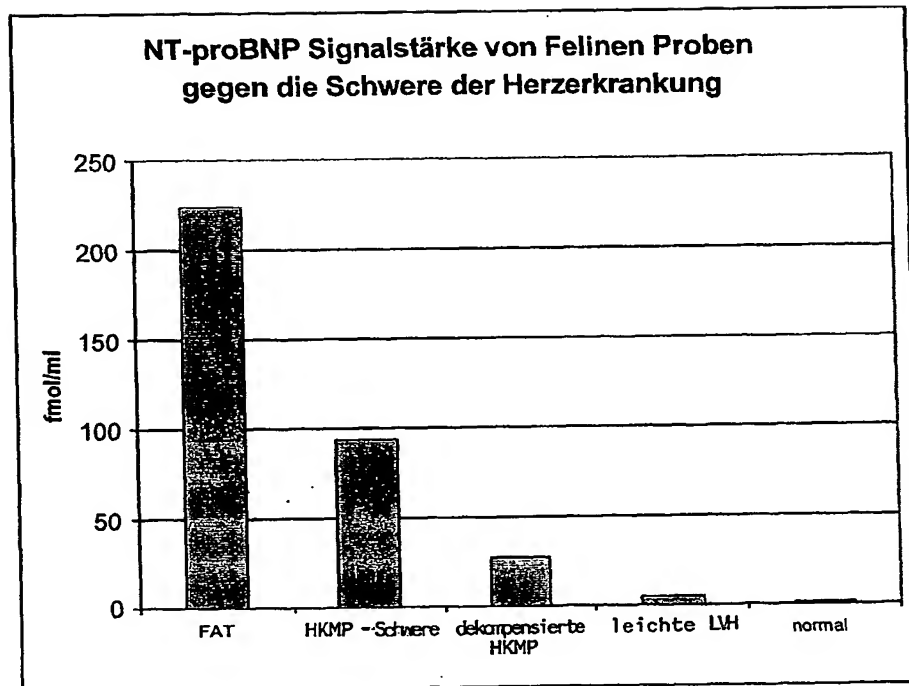


Fig. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/054446

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national Classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (Classification System followed by Classification Symbols) GOIN		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal , BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	US 6 586 396 B1 (SEILHAMER J. J. ET AL.) 1 July 2003 (2003-07-01) abstract; Claims 1-10; figures 5,8 column 18, lines 35-55	1,3-10, 13-28
X	BIONDO A.W. ET AL. : "Immunohistochemistry of atrial and brain natriuretic peptides in control cats and cats with hypertrophic cardiomyopathy. " VETERINARY PATHOLOGY, vol. 40, no. 5, September 2003 (2003-09) , pages 501-506, XP002355515 ISSN: 0300-9858 cited in the application on abstract Material and Methods	2,4-10, 12, 16-22
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 November 2005		Date of mailing of the international search report 08/12/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Barz, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/054446

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	US 5 114 923 A (SEILHAMER J.J. ET AL.) 19 May 1992 (1992-05-19)	16-20
A	abstract; Claims 1-4; figure 3	1-15, 21-28
X	EP O 648 228 A (MEDINNOVA SF) 19 April 1995 (1995-04-19)	16-20
A	cited in the application on Claims 1-15; examples 1-3	1-15, 21-28
Y	US 2004/096920 A1 (DAVEY M. ET AL.) 20 May 2004 (2004-05-20)	1
	abstract; Claim 1; figure 1	
Y	wo 00/45176 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; KARL, JOHANN; LILL, HELMUT; STAHL, PETER; KRUE) 3 August 2000 (2000-08-03)	1
	abstract; Claims 1-19; examples 2-6	
X	US 2003/069186 A1 (BURNETT J.C. ET AL.) 10 April 2003 (2003-04-10)	16-20,22
	Claims 1-21 ; figure 1	
A	wo 00/71576 A (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH) 30 November 2000 (2000-11-30)	1-28
	the whole document	
A	JORTANI S.A. ET AL.: "Strategies for developing biomarkers of heart failure." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 50, no. 2, February 2004 (2004-02) , pages 265-278, XP002355516 ISSN: 0009-9147 cited in the application on the whole document	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2005/054446

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-10, 21, 23 and 28 relate to methods for treatment of the animal body by surgery ("Preparation of a feline or canine sample), the search was carried out and was based on corresponding methods which do not involve such treatment by surgery.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/054446

Patent document dated in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6586396	BI	01-07-2003	NONE
US 5114923	A	19-05-1992	NONE
EP 0648228	A	19-04-1995	AT 172989 T 15-11-1998 AU 667223 B2 14-03-1996 AU 4340593 A 30-12-1993 CA 2136961 A1 09-12-1993 DE 69321955 D1 10-12-1998 DE 69321955 T2 10-06-1999 DK 648228 T3 19-07-1999 ES 2123056 T3 01-01-1999 WO 9324531 A1 09-12-1993 JP 3375630 B2 10-02-2003 JP 7507210 T 10-08-1995 US 5786163 A 28-07-1998
US 2004096920	AI	20-05-2004	US 2004096919 AI 20-05-2004
WO 0045176	A	03-08-2000	AU 758562 B2 27-03-2003 AU 2545100 A 18-08-2000 CA 2359667 A1 03-08-2000 CN 1339107 A 06-03-2002 EP 1151304 A2 07-11-2001 HU 0105195 A2 29-04-2002 JP 2003508724 T 04-03-2003 NO 20013698 A 28-09-2001 NZ 512762 A 28-02-2003 PL 364798 A1 13-12-2004
US 2003069186	AI	10-04-2003	AU 2433901 A 25-06-2001 CA 2395585 A1 21-06-2001 EP 1242452 A2 25-09-2002 JP 2003517005 T 20-05-2003 WO 0144284 A2 21-06-2001 US 6407211 B1 18-06-2002 US 2002082219 A1 27-06-2002
WO 0071576	A	30-11-2000	AU 5043900 A 12-12-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/054446

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
GOIN

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 586 396 B1 (SEILHAMER J.J. ET AL.) 1. Juli 2003 (2003-07-01) Zusammenfassung; Ansprüche 1-10; Abbildungen 5,8 Spalte 18, Zeilen 35-55	1,3-10, 13-28
X	BIONDO A.W. ET AL.: "Immunohistochemistry of atrial and brain natriuretic peptides in control cats and cats with hypertrophic cardiomyopathy." VETERINARY PATHOLOGY, Bd. 40, Nr. 5, September 2003 (2003-09), Seiten 501-506, XP002355515 ISSN: 0300-9858 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Material and Methods	2,4-10, 12,16-22

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung einer Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. November 2005

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

08/12/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Barz, W

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/054446

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ⁹	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 114 923 A (SEILHAMER J. J. ET AL.) 19. Mai 1992 (1992-05-19)	16-20
A	Zusammenfassung; Ansprüche 1-4 ; Abbi ldung 3	1-15, 21-28
X	EP 0 648 228 A (MEDINNOVA SF) 19. Apri l 1995 (1995-04-19)	16-20
A	in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-15; Bei spiel e 1-3	1-15, 21-28
Y	US 2004/096920 A1 (DAVEY M. ET AL.) 20. Mai 2004 (2004-05-20)	1
	Zusammenfassung; Anspruch 1; Abbi ldung 1	
Y	wo 00/45176 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; KARL, JOHANN; LILL, HELMUT; STAHL, PETER; KRUE) 3. August 2000 (2000-08-03)	1
	Zusammenfassung; Ansprüche 1-19; Beispiele 2-6	
X	US 2003/069186 A1 (BURNETT J. C. ET AL.) 10. Apri l 2003 (2003-04-10)	16-20,22
	Ansprüche 1-21 ; Abbi ldung 1	
A	wo 00/71576 A (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH) 30. November 2000 (2000-11-30)	1-28
	das ganze Dokument	
A	JORTANI S.A. ET AL. : "Strategies for devel oping biomarkers of heart fai lure. " CLINICAL CHEMISTRY, Bd. 50, Nr. 2, Februar 2004 (2004-02), Seiten 265-278, XP002355516 ISSN : 0009-9147 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-28

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/054446

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 1-10, 21, 23 und 28 Verfahren zur chirurgischen Behandlung des tierischen Körpers umfassen ("Bereitstellen einer feinen oder caninen Probe"), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf entsprechende Verfahren ohne derartige chirurgische Behandlungsverfahren.
2. ☐ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, dar eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/054446

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 6586396	Bl	01-07-2003	KEINE		
US 5114923	A	19-05-1992	KEINE		
EP 0648228	A	19-04-1995	AT	172989 T	15-11-1998
			AU	667223 B2	14-03-1996
			AU	4340593 A	30-12-1993
			CA	2136961 A1	09-12-1993
			DE	69321955 D1	10-12-1998
			DE	69321955 T2	10-06-1999
			DK	648228 T3	19-07-1999
			ES	2123056 T3	01-01-1999
			WO	9324531 A1	09-12-1993
			JP	3375630 B2	10-02-2003
			JP	7507210 T	10-08-1995
			US	5786163 A	28-07-1998
US 2004096920	Al	20-05-2004	US	2004096919 Al	20-05-2004
WO 0045176	A	03-08-2000	AU	758562 B2	27-03-2003
			AU	2545100 A	18-08-2000
			CA	2359667 A1	03-08-2000
			CN	1339107 A	06-03-2002
			EP	1151304 A2	07-11-2001
			HU	0105195 A2	29-04-2002
			JP	2003508724 T	04-03-2003
			NO	20013698 A	28-09-2001
			NZ	512762 A	28-02-2003
			PL	364798 A1	13-12-2004
US 2003069186	Al	10-04-2003	AU	2433901 A	25-06-2001
			CA	2395585 A1	21-06-2001
			EP	1242452 A2	25-09-2002
			JP	2003517005 T	20-05-2003
			WO	0144284 A2	21-06-2001
			US	6407211 B1	18-06-2002
			US	2002082219 A1	27-06-2002
WO 0071576	A	30-11-2000	AU	5043900 A	12-12-2000